

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11051940 A**

(43) Date of publication of application: **26.02.99**

(51) Int. Cl

**G01N 33/576**  
**C12N 5/10**  
**C12N 15/02**  
**G01N 33/577**  
**// C12P 21/08**  
**(C12P 21/08 , C12R 1:91 )**

(21) Application number: **09209515**

(22) Date of filing: **04.08.97**

(71) Applicant: **TONEN CORP**

(72) Inventor: **AOYANAGI KATSUMI**  
**OUE CHIHARU**  
**KIMURA TATSUJI**  
**IIDA KUMIKO**  
**YAGI SHINTARO**

**(54) DETECTING/MEASURING METHOD FOR HCV**

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To simply detect and quantify HCV with high sensitivity by processing a specimen containing HCV with a processing solution containing chaotropic ions and an acidifier.

**SOLUTION:** The problem of acid treatment such as the formation of precipitates and the contradictory problem of guanidine treatment are resolved when acid treatment and guanidine treatment are combined. When a

surfactant is added to a treating agent generating chaotropic ions such as guanidine and a treating agent constituted of an acidifier, a further favorable result is obtained. Hydrochloric acid, sulfuric acid, acetic acid, trifluoroacetic acid, and trichloroacetic acid are suitable for the acidifier. A specimen containing virus grains such as HCV is processed by these methods, and a virus antigen can be simply detected and quantified with good sensitivity by the so-called immunoassay detecting the antigen with an antibody used as a probe.

**COPYRIGHT: (C)1999,JPO**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-51940

(43) 公開日 平成11年(1999) 2月26日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 33/576

G 0 1 N 33/576

Z

C 1 2 N 5/10

33/577

B

15/02

C 1 2 P 21/08

G 0 1 N 33/577

C 1 2 N 5/00

B

// C 1 2 P 21/08

15/00

C

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-209515

(22) 出願日

平成9年(1997) 8月4日

(71) 出願人 390022998

東燃株式会社

東京都渋谷区広尾一丁目1番39号 恵比寿  
プライムスクエアタワー

(72) 発明者 青柳 克己

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1  
号 東燃株式会社総合研究所内

(72) 発明者 大植 千春

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1  
号 東燃株式会社総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

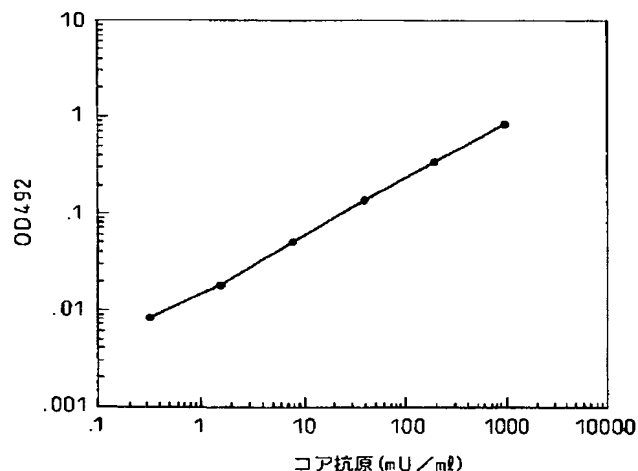
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H C V の検出又は測定方法

(57) 【要約】

【課題】 H C V を簡便で高感度に検出または測定する方法の提供。

【解決手段】 H C V を含む検体を、(1) カオトロピックイオン、及び(2) 酸性化剤を含む処理液で処理することを特徴とする H C V 含有検体の処理方法；並びにこの方法の実施のためのモノクローナル抗体及びそれを生産するハイブリドーマ。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 HCVを含む検体を、(1)カオトロピックイオン、及び(2)酸性化剤を含む処理液で処理することを特徴とするHCV含有検体の処理方法。

【請求項2】 HCVを含む検体を、(1)カオトロピックイオン、(2)酸性化剤、及び(3)非イオン性界面活性剤を含む処理液で処理することを特徴とするHCV含有検体の処理方法。

【請求項3】 請求項1～2のいずれか1項に記載の検体処理方法を用いて、HCVコア抗原を特異的に認識するプローブを反応させることにより、HCVコア抗原の存在を検出又は定量することを特徴とするHCVの測定方法。

【請求項4】 HC11-11(FERM BP-6005)であるハイブリドーマ細胞株。

【請求項5】 HC11-11(FERM BP-6005)から成るハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体。

【請求項6】 請求項3に記載の免疫測定方法に用いるための、カオトロピック剤を含んで成る、検体中のHCVの有無を判別するキット、定量するキット又は診断薬。

【請求項7】 請求項3に記載の免疫測定方法に用いるための、ハイブリドーマHC11-14(FERM BP-6006)、HC11-10(FERMBP-6004)またはHC11-11(FERM BP-6005)により生産されるモノクローナル抗体を含んで成る、検体中のHCVの有無を判別するキット、定量するキット又は診断薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はHCVの検出又は測定方法、及びそのための試薬に関する。

## 【0002】

【従来の技術】C型肝炎は、長い間その原因因子が明らかではなかったが、その遺伝子がクローニングされ(Science 244:359-362, 1989)、その遺伝子を基に作られたリコンビナント抗原を用いた抗体測定による診断法が開発されたことにより(Science 244:362-364, 1989);特表平2-500880号公報)、HCV(C型肝炎ウイルス、Hepatitis C Virus)を原因因子とする、血液及び血液関連製剤を主たる感染経路とする感染症であることが明らかとなった。組換えコア抗原、組換えNS3抗原を加えたいわゆる第2世代抗体検査法の開発により、HCV感染者のほとんどを血清検査により判別する事が可能となった。このことにより国内献血による感染をほとんど絶つことが可能となった。

【0003】しかしHIV(ヒト免疫不全症ウイルス)などの一般的なウイルス感染症同様に、感染初期の抗体

が生じて来るまでの期間、いわゆるウィンドピリオドと呼ばれる判別不能期間が存在し、売血が認められている地域などや国内の一部でも抗体検査では判別できなかった血液由来の成分により、依然として二次感染が起こるリスクが存在している。また抗体検査は、その原理から感染後治癒した既往者か、活動性の感染者か否かを判別することが出来ないことが問題である。

【0004】また現在C型肝炎の治療にはインターフェロン(IFN)が用いられているが、IFNによりHCVが駆除されて6ヶ月後にはHCV抗体価が低下することから、HCV抗体価を測定することのみにて治療効果を判別することが可能であるとする研究者もいる。しかし抗体価の動きは抗原刺激低下後、すなわち抗原駆除後数ヶ月間以降でないと低下しないことから、抗体検査を行なうのみではIFN投与によりHCVが駆除されたか否かを適時に的確に判別することが出来ない。すなわち治療のモニタリングを行なうためには、HCVに対する抗体ではなく、HCVそのものを検出する方法が必要である。

【0005】HCVは他のウイルスたとえばHBV(B型肝炎ウイルス)などに比して血中ウイルス量が低い事、および生体外(in vitro)で、または動物などを宿主としてウイルスを増殖させることが出来ないため、ウイルス粒子(ウイルス抗原)を直接検出する方法を確立することが困難であった。そのためウイルス抗原を検出する代わりにPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法(Science 230:1350-1354, 1985)や分岐鎖DNAプローブ法により、ウイルスゲノムRNAを検出する方法が開発された。しかしウイルスゲノムを検出する方法は、ウイルス抗原を検出する方法と比較していくつかの問題点がある。

【0006】まず検出する物質がRNAであるため保存安定性が低いため、血清の凍結融解操作により定量値が低下するなどの問題が指摘されている。そのため従来の血清検査法よりも検体の保存に留意する必要がある。また検体の輸送の際にも細心の注意をはらう必要がある。

【0007】例えばPCR法を用いた検査法は、遺伝子断片を検出するには最も高感度な検出方法であるが、検体中からHCVゲノムRNAを抽出する際、またゲノムRNAから鋳型DNAへの逆転写の際にロスを生じやすく安定した定量値を得るためには熟練を要すること、また増幅を行うことが重要な原理であるために、コンタミネーションを起こした際に高頻度に偽陽性を生ずるなどの問題があり、一度に大量の検体を処理することができない。

【0008】また簡便とされる方法を用いても前処理時間が2時間以上も必要であり、多数回の遠心操作を含むなど煩雑である。加えて、このように操作が繁雑である

ために、コンタミネーションの機会が増え、偽陽性検体の生じる可能性を増加させている。一方分岐鎖DNAプローブ法は検出感度が低く、結果が得られるまで約20時間を要し（医学と薬学 31:961-970, 1994）、感度、操作時間という点で課題が残されている。

【0009】上記のウィルスゲノムを検出する方法の問題点を解決するために、ウィルス抗原を直接検出する方法も開発された。特開平8-29427に示されているように、HCVのコア抗原に対して特異性を有するモノクローナル抗体を用いて、血清中のコア抗原を検出する方法が開発された。本報は田中等（Journal of Hepatology 23:742-745, 1995）および河合等（医学と薬学 36:1065-1070, 1996）に報告されているように血清中に存在するコア抗原を検出することにより、上記のウィルスゲノムを検出する方法同様に臨床的有用性を持つことが示されている。しかしながらウィルスゲノム検出法と同様にいくつかの点で大きな課題が残されている。

【0010】一点はPCR法と比較して感度が低いこと、血清スクリーニングの最終検査に用いることが出来ないことである。田中等は（Journal of Hepatology 23:742-745, 1995）、HCV RNA量として、 $10^4 \sim 10^5$  コピー/ml間が検出限界であることを示しており、河合等は（医学と薬学 36:1065-1070, 1996）、最も感度が高い検出方法であるCRT（コペテブリバーストランスクリプション）-PCR法でRNA陽性に分類されるC型慢性肝炎患者102例の治療前血清において、67%の陽性率であることを報告している。すなわち、感度の高いCRT-PCR法と比較した場合に感度の面で大きく劣っている。

【0011】さらに測定のための検体処理の工程が複雑であり、かつ時間がかかることがスクリーニングなどの用途に用いようとした際に問題となる。すなわち検体（血清）の処理のために、ウィルス粒子の濃縮と血清成分の除去のためのポリエチレングリコール（PEG）処理（4℃1時間）、遠心操作（15分間）、上清の除去、尿素処理、アルカリ処理（37℃30分間）、中和剤添加といった多段階処理工程を必要とする。また強固に形成され、PEGにより粘性を増した沈殿の尿素処理による分散工程は、非常に熟練を要する作業である。そのため、再現性を得るためには熟練が必要であり、また最低約2時間の処理時間が必要である。さらに遠心操作、上清除去等の工程があるために、自動化および同時大量処理を困難にしておき、操作面においてもスクリーニングなどの大量処理を必要とする用途に適していない。

【0012】一方ウィルス抗原検出系は、以下の点で高感度PCR法と比較して優れている点がある。すなわち

検出過程で過度の増幅処理操作が加わらないため、コンタミネーションに対し、極めて寛容である。またRNAのように不安定な物質を検出するのではなく、比較的安定な物質である抗原蛋白質を検出することから、検体の保存に過度の注意をはらう必要がなく、PCR検体に求められる超低温槽のような特別な機器を用いる必要もなく、また検体の輸送も容易になる。

【0013】これらの特長は例えば血液事業や、健康診断の様に、多数の検体を測定する用途には必須の要件である。しかしながら、既に指摘したように、開示されているコア抗原検出法は、前処理が煩雑で自動化に適していない、感度が低く例えば血液事業などの感度が求められる様な用途におけるゴールドスタンダードにはなり得ないなどの理由により、多数の検体を扱ういわゆるスクリーニング用途に用いることが出来ず、PCR法に対して優れている点を活かすことが出来ていない。また、臨床的に有用性が高い測定方法は、常に感度、特異性、再現性、操作性、低コストを課題とし、これらを全て満たすように鋭意開発していく必要がある。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、血液事業や、健康診断のような、いわゆるスクリーニング用途のごとく多数の検体を処理するのに適したHCV抗原検出法を提供することである。すなわちPCR法と比較し同等の感度、特異度を持ち、前処理を簡便化することにより、容易に自動化などの大量処理システムに適用可能なHCV抗原検出及び定量する系を提供することである。さらに、HCVと同様の構造を持つウィルス抗原の検出及び定量する系を提供することである。

【0015】

【課題を解決するための手段】HCVは血中濃度が $10^2 \sim 10^6$  コピー/mlであり、HBV（ $10^9$  コピー/ml）と比較し低いことから、ウィルス抗原を検出するためには極めて高い感度を必要とする。一般に抗体をプローブとする免疫学的な手法に代表される検出方法に於て、検出感度を増加させる方法としては、I）検出する抗原分子の分子数を上昇させる、II）抗原に結合するプローブ、例えば抗体の分子数を上昇させる、III）検出感度の下限を規定するプローブ、例えば抗体と抗原以外の物質との結合などに起因する非特異反応を減少させる、IV）検出に用いる標識物の検出感度を増加させる方法が考えられ、これらの方法を組み合わせることにより感度を上昇させることが可能となる。

【0016】抗原分子数を増加させる方法としては、I-1）検体の量を増加させる事が最も容易に考えられることであるが、一般的に用いられている反応系（例えば96wellイムノプレート）では最大添加可能な容量は $300 \mu\text{l}$ 程度であり自ずと上限が規定されるので、I-2）濃縮により反応系に加える分子数を増加させる方法が用いられる。

【0017】抗原に結合する検出のためのプローブ、例えば抗体の分子数を上昇させるためには、II-1) 複数のプローブ、例えば抗体を用いることにより認識エピトープの数を増加させる、II-2) プローブ、例えば抗体と抗原との親和性(アフィニティー及びアビディティー)を上昇させることにより、単位時間あたりに結合する抗体の数を増加させる事が容易に考えつく手法である。ここで抗原とプローブ、例えば抗体の親和性を向上させる方法としては、反応系の緩衝液の組成を変化させる方法、プローブを改変する方法、これらの組み合わせが考えられる。II-3) ビーズや磁性粒子などの表面積の広い担体に多量に抗体を結合させることによって、限られた量の抗原との反応面積を広くすることにより、多くの抗原を捕獲することも考えられる。

【0018】また感染症の場合は検体中に抗原と結合する高い親和性を示すヒト抗体が存在することが予想され、これらの抗体のエピトープが検出に用いるプローブ、例えば抗体のエピトープと重なることにより競合反応が起こり検出に用いる抗体数の減少につながるものが予想されるため、この検体中の反応を阻害する抗体を除く事により抗原に結合する検出のための抗体の分子数を増加させる事につながる(II-4)。

【0019】非特異反応を減少させる方法を一般化することは困難であるが、III-1) 緩衝液組成を変化させることによりプローブ、例えば抗体の抗原との親和性(アフィニティー及びアビディティー)を上昇させることにより非特異反応を軽減させる、III-2) 非特異反応の原因物質を除去するなどの方策が考えられる。標識物の検出感度を上昇させる方法としては、IV-1) 検出感度の高い標識物(放射性同位元素など)を用いる、IV-2) 酵素や触媒を標識物に用いることにより信号を増幅させる、IV-3) 酵素基質をより感度の高い基質に改変する、IV-4) 酵素反応、化学反応の基質のシグナルを化学的、または電氣的、機械的に増幅させる、IV-5) 抗体当たりの標識物の数を増加させる、IV-6) シグナルの検出に用いる機器の感度を上昇させるなどの方法が考えられる。

【0020】開示されているHCVコア抗原検出法の前処理法の工程を解析すると、検体にポリエチレングリコールを加えた後に遠心操作によりHCVを沈殿として回収することにより抗原を濃縮する(I-2) ことと同時に血清成分の一部を除去する(II-2) 工程を行った後、尿素とアルカリ剤を含む溶液に再懸濁することにより検体中に存在するヒト抗体を不活化し(II-3) HCVからコア抗原を遊離させさせる工程、非イオン性界面活性剤(Triton-X100)と中和剤を含む溶液を加えることにより、モノクローナル抗体と反応させる溶液にする工程から成り立っている。

【0021】既に上記に指摘したように遠心操作、沈殿の再懸濁操作が操作上煩雑な過程であり、熟練度を必要

とする過程である。従って本発明の達成目標は、これらの操作上の問題点を解決したコア抗原検出系である。HCVそれ自体はいまだその姿が明らかとなっていないが、そのゲノム構造、類縁のウィルス粒子の構造、一般的なウィルスに関する情報から、HCV粒子はゲノムRNAがコア抗原によりパッキングされ、それを取り囲むように脂質膜にアンカリングしているE1、E2/NS1抗原からなる外被蛋白質によって囲まれた状態で存在するものと推定される。

10 【0022】そのためコア抗原を検出するためには外被を取り除き、コア抗原の検出に用いるプローブ、例えば抗体が結合できるようにする必要がある。またウィルス粒子は血中ではLDL(低密度リポ蛋白質)などに囲まれた複合構造をしていることが報告されており、さらに外被蛋白質に対する抗体も存在することから、ウィルス粒子と抗外被蛋白質抗体との免疫複合体としても存在することが予想される。すなわち検出する抗原の分子数を増加させるためには、ウィルス粒子から効率よく外被やウィルス粒子を取り囲む夾雑物を取り除き、かつコア抗原分子を効率よく遊離させることが最も重要である。

20 【0023】従って、本発明が提供する要件の一つは、検体(血清)中のHCVコア抗原を、遠心分離のような煩雑な操作によって濃縮することなく、プローブを用いた検出に適した状態にさせる処理方法にある。さらに上記のように検体中には検出に用いるプローブ、例えば抗体と結合を競合するヒト抗体が高力価で存在するため、これを取り除く操作が、感度上昇のために重要である。従って本発明の重要な要件の一つは、検体中のHCVコア抗原を簡易に遊離させる処理方法によって、検体中に存在するヒト抗体をも同時に不活化させる処理方法にある。

30 【0024】本発明によって示される処理方法を用いることにより、検体中に存在するHCVコア抗原は、プローブ、例えば抗体との免疫複合体を形成するのに適した状態でウィルス粒子または免疫複合体から遊離し、同時に検出反応を阻害する検体中に存在するヒト抗体をも同時に不活化させることにより、例えば抗体のようなプローブを用いた免疫測定法によって容易にかつ感度高く検出することが可能となる。

40 【0025】検出に用いるプローブ、例えば抗体はHCVのコア抗原に特異的に結合するもので有り、一定の高い親和性を示し、反応系に加えた際に非特異反応などを誘発しないようなものであればかまわないが、一次反応に用いるプローブの一つはHCVコア抗原のN端側を認識し結合できるものが含まれていることが好ましい。ここでコア抗原のN端側とは、配列番号2に示す配列の10番目から70番目の配列、もしくはその一部をいう。さらにここにコア抗原のC端側に対するプローブが含まれていても良い。ここでコア抗原のC端側とは、配列番号2に示す配列81番目から160番目の配列、もしくは

はその一部をいう。

【0026】ここでプローブとは、マウス、ウサギ、ニワトリ、ヤギ、ヒツジ、ウシなどの実験動物を免疫して得られるポリクローナル抗体、免疫した個体から、脾臓細胞を分離し、ミエロマ細胞と融合させることによって得られるハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体、または脾臓細胞、血中白血球をEBウイルスによって不死化させた細胞の産生するモノクローナル抗体、HCVに感染しているヒト、チンパンジーなどが産生しているモノクローナル抗体、マウス、ヒトなどのイムノグロブリンのcDNA、染色体DNAから得られる可変領域遺伝子断片、またはイムノグロブリンのcDNA、染色体DNAの一部と人工的に作製した配列とを組み合わせることによって構成される可変領域遺伝子断片、人工的な遺伝子配列を用いて構成される可変領域遺伝子断片、またはこれらを材料に遺伝子組換え手法によって作製される可変領域遺伝子断片を、イムノグロブリン定常領域遺伝子断片を組み合わせることによって構成される組換え抗体遺伝子によって形質転換された細胞が産生する組換え抗体、上記の可変領域遺伝子断片と例えばバクテリオファージの構造蛋白質と融合させて作られるファージ抗体、上記の可変領域遺伝子断片を他の適用な遺伝子断片例えばmyc遺伝子の一部などと組み合わせることにより構成される組換え抗体遺伝子によって形質転換された細胞が産生する組換え抗体、トリプシン分子に可変領域を人工的に導入することによって産生されるプローブ、レセプターなどの蛋白質に特異的に結合する分子を人工的に改変することによって得られるプローブ、その他コンビナトリアルケミストリー技術によって作製されたプローブなど、コア抗原に高い特異性、親和性を示す分子であればそれを用いることが出来る。

【0027】さらに、本発明はHCVコア抗原を含む検体から、HCVコア抗原とプローブ、例えば抗体との免疫複合体を形成するのに適した状態にするため、ウイルス粒子または免疫複合体から遊離し、同時に検出反応を阻害する検体中に存在するヒト抗体をも同時に不活性化させる処理剤によって検体を処理する工程、遊離したコア抗原を例えば抗体のようなプローブを用いた免疫測定法によって検出並びに定量するアッセイ方法、並びに検査キットを提供する。

【0028】

【発明の実施の形態】

本発明によって示される検体処理剤と処理方法

本発明における検体には、全血、血漿、血清、尿、唾液、脳脊髄液などの生物学的体液、および肝組織などが含まれる。本発明においては、検体を煩雑な操作なく、プローブ例えばモノクローナル抗体と結合反応させるのに適した状態に検体中のコア抗原を処理する方法が最も重要な要件である。すなわち、抗原分子数を増加させるために、ウイルス粒子中などに含まれるコア抗原を効率

よく遊離させることが重要になる。

【0029】HCVの外被蛋白質などの膜タンパク質などは、何らかの処理をしない限り水に溶けることは無い。このような疎水性部分をその一部に持つ蛋白質を水に溶かすには、界面活性剤を用い、疎水性部分を親水性に変換させることによる方法がよく知られているが、グアニジン塩酸などのある種の塩はこのような難溶性の蛋白質を水に溶けやすくさせる性質を持っていることが知られている。このような性質を示す塩（カオトロピック剤）から生じるイオンはカオトロピックイオンと呼ばれており、陰イオンとしてはグアニジンイオン、チオシアン酸イオン、ヨウ素イオン、過ヨウ素酸イオン、可塩素酸イオンなどが知られており、これらのイオンを生ずる塩が難溶性蛋白質の可溶化に用いられている。カオトロピックイオンは、ウイルス粒子から抗原が効率よく遊離させる機能を持つことが予測された。

【0030】しかしながら、このようなカオトロピックイオンを加えると蛋白質の2次構造が部分的に破壊されるため、その結果としてエピトープ構造が失われる。そのためカオトロピックイオン存在下でそのままプローブ、例えば抗体との免疫複合体形成反応に加えると、抗体の結合が弱められ、感度が低下するので、大きな問題点となると考えられる。

【0031】その一方でカオトロピックイオンの変性作用は可逆的である場合が多く、透析や希釈によりイオン強度を弱めることにより一時的に変性した構造が元に戻る場合がある。このことは、グアニジンなどのカオトロピックイオンによる処理剤を用いた場合のもう一つの問題点を示している。つまり本発明の目標とする処理方法には、検体中に存在するウイルス粒子などに含まれる抗原を効率よく遊離させることのみならず、同時に検体中に存在する抗原に結合する高力価抗体をも失活させる必要がある。すなわち、カオトロピックイオンによる可溶化では、検体中に存在する高力価抗体の失活が不十分で、この抗体の影響により感度が低くなることが考えられる。

【0032】そのためカオトロピックイオンを用いた処理方法は2つの相反する課題を内包している。つまりカオトロピックイオンにより構造を壊すような条件では抗原抗体反応が阻害される、その一方でカオトロピックイオンの効果のみでは検体中の反応を阻害する抗体の不活性化が不十分であり、抗原抗体反応を阻害しない様な状況にした場合、夾雑抗体により反応が阻害される。すなわちこの相反する課題を解決するためには、抗原のエピトープ構造は可逆的に破壊され、検体中の夾雑抗体の機能破壊が不可逆的に起こるような条件を見いだす必要がある。

【0033】抗体の活性を失活させる条件は、アルカリ処理、酸処理などが知られている。血清を酸処理すると、一部の血清蛋白質は非可逆的に変性し沈殿を生じる

ため、検体処理後の例えばピペッティング操作の障害になることが多く、また測定の際に固相に変性蛋白質を巻き込んだ沈殿が吸着し、濁度として検出されることもあり、擬陽性の原因ともなりえる。加えて、それらの沈殿物の中に、非特異的に目的とする抗原が巻き込まれ、プローブとの反応量の減少による感度低下につながるなどの問題点も生じる。

【0034】本発明者は、酸処理とグアニジン処理を組み合わせるにより、沈殿物の形成などの酸処理の問題点、グアニジン処理の相反する問題点が解消されることを見だし本発明を完成させるに至った。また、グアニジンなどのカオトロピックイオンを生じる処理剤と酸性化剤からなる処理剤に、界面活性剤を加えると、さらに好ましいことも見いだした。酸性化剤としては、塩酸、硫酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、トリクロル酢酸などが、適当である。

【0035】また、界面活性剤としては、CHAPS (3-[3-コラミドプロピル]ジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホン酸)、CHAPSO (3-[コラミドプロピル]ジメチルアンモニオ)-2-ヒドロキシー-1-プロパンスルホン酸)、ドデシル-N-ベタインなどの両イオン性界面活性剤や、Triton X100などのポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル類、NP40などのポリオキシエチレンニルフェニルエーテル類、Tween20などのポリオキシエチレンソルビトールエステル類、Brij58のようなポリオキシエチレンドデシルエーテル類、オクチルグルコシドといった非イオン性界面活性剤が適当である。さらにここに尿素などの水素イオン結合を弱めることにより蛋白質の高次構造を部分的に壊す様な作用を示す薬剤を加えてもよい。

【0036】特に、塩酸グアニジン濃度は2M以上で、Triton X100濃度は2%以上で、Tween20濃度は0.02%以上で、4℃から45℃の範囲で使うことがより好ましい。本発明の処理方法を用いることにより、HCVと同様の構造を持つウィルス粒子を含む検体から、ウィルス抗原を、抗体などをプローブとして用いるいわゆる免疫測定方法に適した状態に遊離させることが出来ることは明らかである。ここでHCVと同様の構造を持つウィルスとは、ゲノムRNA、DNAをパッケージする蛋白質と、それを取り囲む膜タンパク質と脂質膜から構成される構造を持つウィルス粒子を形成するウィルスであり、例えばHCVの類縁のウィルスであるフラビウィルス類、ヒト免疫不全ウィルス(HIV)などのレトロウィルスなどが含まれる。さらにゲノムとしてDNAを持つものであっても同様の構造を持つものが含まれる。

【0037】本発明によって示されるプローブとしてのモノクローナル抗体

本発明でいうHCVの構造蛋白質遺伝子断片とは、HC

Vの構造蛋白質遺伝子のコア領域を含む遺伝子断片であり、少なくともHCVのN末端の1番目から160番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA断片である。具体的には、配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子断片である。

【0038】本発明でいうHCV抗原活性を有するポリペプチドとは、抗HCV抗体と免疫学的に反応する融合ポリペプチドもしくはポリペプチドを意味し、本発明のハイブリドーマならびにそれから得られるモノクローナル抗体の作製に利用するための抗原として用いる。具体的には、配列番号1のアミノ酸配列を含むHCV抗原活性を有する融合ポリペプチドもしくは配列番号1のアミノ酸配列の一部を含むHCV抗原活性を有するポリペプチドであり、そのN末端あるいはC末端に余分なアミノ酸配列が付加されたものであってもよい。

【0039】本発明の上記融合ポリペプチドならびに配列番号3～5に示されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対するモノクローナル抗体類は、当業者により容易に作製することができる。ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の作製は良く知られている。例えばBALB/cマウスなどの腹腔内あるいは皮内に、上記融合ポリペプチドもしくはポリペプチド(以下、本抗原)を単独もしくはBSA、KIHなどと結合させた抗原として、単純あるいはフロイント完全アジュバント等のアジュバントと混合して定期的に免疫する。血中の抗体価が上昇した時点で、追加免疫として本抗原を尾静脈内に投与し、無菌的に脾臓を摘出した後、適当なマウス骨髄腫細胞株と細胞融合し、ハイブリドーマを得る。本方法は、KohlerとMilsteinの方法(Nature 256:495-497, 1975)に従って行なうことができる。

【0040】上記方法により得られたハイブリドーマ細胞株を適当な培養液中で培養し、その後、本抗原に対して特異的な反応を示す抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を選択してクローン化する。抗体産生ハイブリドーマのクローニングには限界希釈法のほか軟寒天法(Eur J Immunol, 6:511-519, 1976)などを利用することができる。そして、産生されたモノクローナル抗体をプロテインAなどを用いたカラムクロマトグラフィーなどの方法により精製する。上記のモノクローナル抗体以外にもプローブとして用いる分子は作製することが出来る。例えば組換え抗体については、Hoogenboonの総説などに詳しく記載されている(Trends in Biotechnology, 15:62-70, 1997)。

【0041】プローブを用いた検出系

本発明に従って調製されたモノクローナル抗体は、HCVコア抗原の検出および定量用に、エンザイムリンクイムノソルベントアッセイ(ELISA)、酵素イムノ

ドットアッセイ、ラジオイムノアッセイ、凝集に基づいたアッセイ、あるいは他のよく知られているイムノアッセイ法で検査試薬として用いることができる。また、検出に標識化抗体が使用される場合は、標識化合物としては例えば蛍光物質、化学発光物質、放射性物質、酵素、染色物質などが使用される。

【0042】例えば、検体（血清）中のHCVコア抗原を検出するためにサンドイッチ反応系を原理とした方法を用いる場合、使用すべき診断キットは、固体支持体

（例えばマイクロタイターウェルの内壁）に被覆された本発明の1種類以上のモノクローナル抗体および標識物質と結合させた1種類以上のモノクローナル抗体またはそのフラグメントを含む。固体支持体に固相化するモノクローナル抗体および標識するモノクローナル抗体の組み合わせは自由であり、高感度の得られる組み合わせを選択できる。

【0043】使用できる固体支持体としてはポリスチレンやポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリビニル製のマイクロタイタープレート、試験管、キャピラリー、ビーズ（ラテックス粒子や赤血球、金属化合物など）、膜（リボソームなど）、フィルターなどが挙げられる。

#### 【0044】

【発明の効果】本発明により示される方法により、抗体などをプローブとして抗原を検出するいわゆる免疫測定方法に適した状態に、HCVなどのウイルス粒子から簡便にウイルス抗原を遊離させることが可能となる。また本発明によって示される方法によってHCVなどのウイルス粒子を含む検体を処理することにより、抗体などをプローブとして抗原を検出するいわゆる免疫測定方法により、ウイルス抗原を簡便にかつ感度よく検出、及び定量することが可能となる。また本発明によって示される検体処理方法を用いた免疫測定方法を用いた、検体中のHCVなどのウイルスの有無を判別するキット、定量するキット及び診断薬を作製することが可能となる。

#### 【0045】

【実施例】以下の実施例は本発明を例証するものであるが、これによって本発明の範囲を制限するものではない。

#### 実施例1. HCV由来ポリペプチドの発現および精製

##### (A) 発現プラスミドの構築

HCVのコア領域に相当する発現プラスミドは以下の方法で構築した。C11-C21クローンおよびC10-E12クローン（特開平6-38765）をpUC119に組み込んで得られたプラスミドpUC・C11-C12およびpUC・C10-E12の各DNA1μgを制限酵素反応液20μl〔50mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ジチオスレイトール、100mM NaCl, 15単位のEcoRIおよび15単位のClaI酵素〕中、および〔10mM

Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mMジチオスレイトール、50mM NaCl, 15単位のClaIおよび15単位のKpnI酵素〕中で各々37℃1時間消化し、その後0.8%アガロースゲル電気泳動を行ない、約380bpのEcoRI-ClaI断片および約920bpのClaI-KpnI断片を精製した。

【0046】この2つのDNA断片とpUC119をEcoRIおよびKpnIで消化したベクターに10×リガーゼ用緩衝液〔660mM Tris-HCl (pH7.5), 66mM MgCl<sub>2</sub>, 100mMジチオスレイトール、1mM ATP〕5μl, T4リガーゼ 1μl (350単位/μl)に水を加えて50μlとし、16℃で一晩保温し、連結反応を行なった。このプラスミドを用いた大腸菌JM109を形質転換させ、プラスミドpUC・C21-E12を得た。

【0047】このプラスミドpUC・C21-E12 DNA1ngを2つのプライマー（5'-GAATTCA TGGGCACGAATCCTAAA-3'（配列番号：6）、5'-TTAGTCCTCCAGAACCC GGAC-3'（配列番号：7））を用いPCRを行なった。PCRはGeneAmp™ (DNA Amplification Reagent Kit, Perkin Elmer Cetus製)のキットを用いDNA変性95℃15分、アニーリング50℃2分、DNA合成70℃3分の条件で行ない、得られたDNA断片を0.8%アガロースゲル電気泳動により分離し、ガラスパウダー法（GeneClean）で精製した。

【0048】一方、pUC19を制限酵素SmaIで消化し、PCR法によって得られたDNA断片を10×リガーゼ用緩衝液〔660mM Tris-HCl (pH7.5), 66mM MgCl<sub>2</sub>, 100mMジチオスレイトール、1mM ATP〕5μl, T4リガーゼ 1μl (350単位/μl)に水を加えて50μlとし、16℃で一晩保温し、連結反応を行なった。このプラスミドを用いた大腸菌JM109を形質転換させ、プラスミドpUC19・C21-E12・SmaIを得た。このプラスミドDNA1μgを制限酵素反応液20μl〔150mM NaCl, 6mM Tris-HCl (pH7.5), 6mM MgCl<sub>2</sub>, 15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素〕中で37℃1時間消化反応を行ない、その後0.8%アガロースゲル電気泳動を行ない、約490bpのEcoRI-BamHI断片を分離し、これをガラスパウダー法で精製した。

【0049】次に発現ベクターであるTrp・TrpE（特開平5-84085）のDNA1μgを制限酵素反応液20μl〔150mM NaCl, 6mM Tris-HCl (pH7.5), 6mM MgCl<sub>2</sub>, 15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素〕中で37℃で1時間消化し、その反応液に水39μlを加え、70℃で5分間熱処理した後にバクテリアアルカリ性ホスフ



アターゼ (BAP)  $1 \mu\text{l}$  ( $250$  単位/ $\mu\text{l}$ ) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で  $1$  時間保温した。

【0050】この反応液にフェノールを加えてフェノール抽出を行ない、得られた水層をエタノール沈殿し、沈殿物を乾燥した。得られた  $\text{E} \circ \circ \text{R} \text{I} - \text{B} \text{a} \text{m} \text{H} \text{I}$  処理ベクター-DNA  $1 \mu\text{g}$  と上述のコア  $160$  断片を  $10 \times$  リガーゼ用緩衝液 [ $660 \text{mM}$   $\text{T} \text{r} \text{i} \text{s} - \text{H} \text{C} \text{l}$  ( $\text{pH} 7.5$ ),  $66 \text{mM}$   $\text{M} \text{g} \text{C} \text{l}_2$ ,  $100 \text{mM}$  ジチオスレトール,  $1 \text{mM}$   $\text{A} \text{T} \text{P}$ ]  $5 \mu\text{l}$ ,  $\text{T} 4$  リガーゼ  $1 \mu\text{l}$  ( $350$  単位/ $\mu\text{l}$ ) に水を加えて  $50 \mu\text{l}$  とし、 $16^\circ\text{C}$  で一晩保温し、連結反応を行なった。

【0051】この反応液の  $10 \mu\text{l}$  を用いて大腸菌  $\text{H} \text{B} 101$  株を形質転換した。形質転換に用いる感受性大腸菌株は塩化カルシウム法 [Mandel, M. と Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159-162 (1970)] により作られる。形質転換大腸菌を  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む  $\text{L} \text{B}$  プレート ( $1\%$  トリプトン,  $0.5\%$   $\text{N} \text{a} \text{C} \text{l}$ ,  $1.5\%$  寒天) 上に塗布し、 $37^\circ\text{C}$  に一晩保温した。プレート上に生じた菌のコロニーを  $1$  白金耳取り、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む  $\text{L} \text{B}$  培地に移し、一晩  $37^\circ\text{C}$  で培養した。

【0052】 $1.5 \text{ml}$  の菌培養液を遠心して集菌し、プラスミド DNA のミニプレパレーションをアルカリ法 [Manniat's ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1982)] により行なった。得られたプラスミド DNA  $1 \mu\text{g}$  を制限酵素反応液  $20 \mu\text{l}$  [ $150 \text{mM}$   $\text{N} \text{a} \text{C} \text{l}$ ,  $6 \text{mM}$   $\text{T} \text{r} \text{i} \text{s} - \text{H} \text{C} \text{l}$  ( $\text{pH} 7.5$ ),  $6 \text{mM}$   $\text{M} \text{g} \text{C} \text{l}_2$ ,  $15$  単位の  $\text{E} \circ \circ \text{R} \text{I}$  および  $15$  単位の  $\text{B} \text{a} \text{m} \text{H} \text{I}$  酵素] 中で  $37^\circ\text{C}$   $1$  時間消化し、アガロースゲル電気泳動を行なって、約  $490 \text{bp}$  の  $\text{E} \circ \circ \text{R} \text{I} - \text{B} \text{a} \text{m} \text{H} \text{I}$  断片が生じる  $\text{T} \text{r} \text{p} \cdot \text{T} \text{r} \text{e} \text{E}$  コア  $160$  発現プラスミドを選別した。

【0053】(B) クローンコア  $160$  でコードされるポリペプチドの発現および精製  
発現プラスミド  $\text{T} \text{r} \text{p} \cdot \text{T} \text{r} \text{p} \text{E}$  コア  $160$  をもつ大腸菌  $\text{H} \text{B} 101$  株を  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む  $3 \text{ml}$  の  $2 \text{YT}$  培地 ( $1.6\%$  トリプトン、 $1\%$  酵母エキス,  $0.5\%$   $\text{N} \text{a} \text{C} \text{l}$ ) に接種し、 $37^\circ\text{C}$  で  $9$  時間培養する。この培養液  $1 \text{ml}$  を  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む  $100 \text{ml}$  の  $\text{M} 9 - \text{C} \text{A}$  培地 ( $0.6\%$   $\text{N} \text{a}_2 \text{H} \text{P} \text{O}_4$ ,  $0.5\%$   $\text{K} \text{H}_2 \text{P} \text{O}_4$ ,  $0.5\%$   $\text{N} \text{a} \text{C} \text{l}$ ,  $0.1\%$   $\text{N} \text{H}_4 \text{C} \text{l}$ ,  $0.1 \text{mM}$   $\text{C} \text{a} \text{C} \text{l}_2$ ,  $2 \text{mM}$   $\text{M} \text{g} \text{S} \text{O}_4$ ,  $0.5\%$  カザミノ酸,  $0.2\%$  グルコース) に植え継ぎ、 $37^\circ\text{C}$  で培養した。OD  $600 = 0.3$  の時に終濃度  $40 \text{mg}/\text{l}$  になるようにインドールアクリル酸を加え、さらに  $16$  時間培養した。この培養液を遠心分離して菌体を集めた。

【0054】菌体に  $20 \text{ml}$  の緩衝液 A [ $50 \text{mM}$   $\text{T} \text{r} \text{i} \text{s} - \text{H} \text{C} \text{l}$  ( $\text{pH} 8.0$ ),  $1 \text{mM}$   $\text{E} \text{D} \text{T} \text{A}$ ,  $30 \text{mM}$   $\text{N} \text{a} \text{C} \text{l}$ ] を加えて懸濁し、再び遠心分離を行なって発現

菌体  $2.6 \text{g}$  を得た。得られた菌体を緩衝液 A  $10 \text{ml}$  中に懸濁し、超音波破碎により大腸菌膜を破碎した後に遠心分離を行ない、 $\text{H} \text{C} \text{V} - \text{c} \text{D} \text{N} \text{A}$  でコードされるポリペプチドと  $\text{T} \text{r} \text{p} \text{E}$  の融合ポリペプチドを含む不溶性画分を得た。その画分を  $10 \text{ml}$  の  $6 \text{M}$  尿素を含む緩衝液 A を加えて融合ポリペプチドを可溶性抽出した。可溶性抽出物を  $\text{S} - \text{S} \text{e} \text{p} \text{h} \text{a} \text{r} \text{o} \text{s} \text{e}$  を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーにかけて、融合ポリペプチドの精製を行なった。

#### 10 【0055】実施例 2. ハイブリドーマの作製法

前記方法により調製した融合ポリペプチド ( $\text{T} \text{r} \text{p} \text{C} 11$ ) を  $6 \text{M}$  尿素溶解後、 $0.15 \text{M}$   $\text{N} \text{a} \text{C} \text{l}$  を含む  $10 \text{mM}$  リン酸緩衝液 ( $\text{pH} 7.3$ ) に終濃度が  $0.2 \sim 1.0 \text{mg}/\text{ml}$  となるように希釈し、等量のアジュバント (タイターマックス) と混和し、 $\text{T} \text{r} \text{p} \text{C} 11$  懸濁液とした。 $\text{T} \text{r} \text{p} \text{C} 11$  濃度が  $0.1 \sim 0.5 \text{mg}/\text{ml}$  となるように調製した該懸濁液を  $4 \sim 6$  週令の  $\text{B} \text{A} \text{L} \text{B} / \text{c}$  系マウスに腹腔内投与した。2 週間ごとに同様の免疫をおこないさらに約 2 週間後、生理食塩に溶解した  $\text{T} \text{r} \text{p} \text{C} 11$   $10 \mu\text{g}$  を尾静脈内に投与した。

【0056】最終追加免疫後 3 日目に、この免疫動物より無菌的に脾臓を摘出し、ハサミで切片としてさらにメッシュを用いて脾臓を個々の細胞にほぐし、 $\text{R} \text{P} \text{M} \text{I} - 1640$  培地で 3 回洗浄した。対数増殖期のマウス骨髄腫細胞株  $\text{s} \text{p} 2 / 0 \text{A} \text{g} 14$  を前記と同様に洗浄後、該細胞  $1.8 \times 10^7$  個と脾臓細胞  $1.0 \times 10^8$  個を  $50 \text{ml}$  容の遠心管に入れ混合した。 $200 \times \text{g}$ 、5 分間遠心分離を行ない、上清を除去し、 $37^\circ\text{C}$  に保温した  $50\%$  ポリエチレングリコール (PEG)  $4000$  (メルク社製) を含む  $\text{R} \text{P} \text{M} \text{I} - 1640$  培地  $1 \text{ml}$  を加えさらに  $\text{R} \text{P} \text{M} \text{I} - 1640$  培地  $10 \text{ml}$  を加えて細胞融合させた。

【0057】融合細胞は、遠心分離 ( $200 \times \text{g}$ 、5 分間) によって PEG を除いた後、 $96$  ウエルプレートを用いて、 $10\%$  ウシ胎児血清ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン (以下、 $\text{H} \text{A} \text{T}$  と省略) を含む  $\text{R} \text{P} \text{M} \text{I} - 1640$  培地中で約  $10$  日間培養してハイブリドーマのみを増殖させた。その後、目的の抗体を産生するクローンを  $\text{E} \text{L} \text{I} \text{S} \text{A}$  法により検索し、所望の反応特異性を有する本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。

【0058】得られたハイブリドーマについて、常法の限界希釈法に従い、単一クローン化を行ない、得られたハイブリドーマを  $\text{H} \text{C} 11 - 14$ 、 $\text{H} \text{C} 11 - 10$ 、および  $\text{H} \text{C} 11 - 11$  と命名した。該 3 種類のハイブリドーマに関しては、生命工学工業技術研究所に平成 7 年 7 月 4 日付で、それぞれ、 $\text{F} \text{E} \text{R} \text{M} \text{B} \text{P} - 6006$ 、 $\text{F} \text{E} \text{R} \text{M} \text{B} \text{P} - 6004$  及び  $\text{F} \text{E} \text{R} \text{M} \text{B} \text{P} - 6005$  として寄託された。

#### 50 【0059】実施例 3. モノクローナル抗体の作製法

実施例2に記載の方法により得られたハイブリドーマをプリスタン等で処理したマウス腹腔に移植し、腹水中に産生されてくるモノクローナル抗体を取得した。該モノクローナル抗体の精製は、プロテインAを結合させたセファロースカラムによりIgGフラクションを分離した。前記3種類のハイブリドーマから産生されたそれぞれのモノクローナル抗体、C11-14、C11-10およびC11-11のアイソタイプは、ウサギ抗マウスIg各アイソタイプ抗体(Zymed社製)を用いたイムノアッセイにより、C11-10がIgG2a、C11-14、C11-11がIgG1であることが明らかとなった。得られた3種類のモノクローナル抗体について、HCVコア領域由来の配列によって合成した20アミノ酸からなる合成ペプチドを用いてエピトープ解析を行なった結果、表1に示す如くコア領域の一部を特異的に認識するモノクローナル抗体であることがわかった。

【0060】

【表1】

表1

抗体	認識部位
C11-10	<sup>21</sup> Asp- <sup>40</sup> Arg (配列番号3)
C11-14	<sup>41</sup> Gly- <sup>50</sup> Arg (配列番号4)
C11-11	<sup>100</sup> Pro- <sup>120</sup> Gly (配列番号5)

#### 【0061】実施例4. 検体処理条件検討 処理条件検討

##### 1) 塩酸グアニジン濃度検討

健常人血清およびHCV-RNA陽性パネル血清100μlに、種々の濃度に溶解した塩酸グアニジンと0.5N HClを含む処理液を100μl添加した。室温で30分間処理をおこない、その80μlを測定試料とした。以下に記す測定法による結果を、横軸に処理反応時の塩酸グアニジン濃度を取り、図1に示した。

##### 【0062】2) Triton X100濃度検討

健常人血清およびHCV-RNA陽性パネル血清100μlに、種々の濃度に溶解したTriton X100を含む処理液(6M塩酸グアニジン、0.5N HCl)を100μl添加した。室温で30分間処理をおこない、その80μlを測定試料とした。以下に記す測定法による結果を、横軸に処理反応時のTriton X100濃度を取り、図2に示した。

##### 【0063】3) Tween 20濃度検討

健常人血清およびHCV-RNA陽性パネル血清100μlに、種々の濃度に溶解したTriton X100を含む処理液(6M塩酸グアニジン、0.5N HCl, 12.5% Triton X100)を100μl添加した。室温で30分間処理をおこない、その80μlを測

定試料とした。以下に記す測定法による結果を、横軸に処理反応時のTween 20濃度を取り、図3に示した。

##### 【0064】4) 反応温度検討

健常人血清およびHCV-RNA陽性パネル血清100μlに、処理液(6M塩酸グアニジン、0.5N HCl, 12.5% Triton X100, 0.75% Tween 20)を100μl添加した。4℃、室温(23℃)、37℃、45℃で30分間処理をおこない、その80μlを測定試料とした。以下に記す測定法を用いて検討した結果を図4に示した。

##### 【0065】測定法

上記の各々の血清処理法によって得られた試料は、以下の測定法を用いて評価した。すなわち、抗HCVコア抗原モノクローナル抗体(抗体C11-14とC11-11の等量混合)を終濃度が計6μg/mlになるように0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈し、96ウエルマイクロプレート(ヌンク社製)1ウエルにつき100μlずつ分注した。4℃で一晩静置後、0.15M NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)0.35mlを用いて2回洗浄し、0.5%カゼイン-Naを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.35)、(以下ブロッキング液)0.35mlを添加し、さらに室温で2時間静置した。

【0066】ブロッキング液除去後、0.15M NaCl, 1% BSA, 0.5%カゼイン-Na, 0.05% Tween 20を含む100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)140μlと1Mトリス20μlを混合したもの計160μl(以下反応緩衝液とする)と、前述した処理法で得られた測定試料80μlをそれぞれのウエルに加え、室温で2時間反応させ、洗浄液300μlで5回洗浄し、さらにペルオキシダーゼ(POD)標識したモノクローナル抗体(C11-10)100μlを添加して室温で30分間反応させた。反応後、上記洗浄液300μlで5回洗浄し、基質(オルトフェニレンジアミン、以下OPD)溶液100μlを加え室温で30分間反応させた後、2N硫酸溶液100μlを添加し、波長630nmの吸光度を対照として波長492nmにおける吸光度(OD492)を測定した。

【0067】図1~4から、処理条件の最適化が行われたが、パネル血清において、未処理検体ではコア抗原の検出が困難であったが、このような極めて簡易な処理を行うことによって、劇的にコア抗原の検出が可能となった。いずれの場合でも、健常人ではシグナルの上昇は認められなかった。また、特に塩酸グアニジン濃度は2M以上で、Triton X100濃度は2%以上で使用することで、4℃から45℃の範囲で、良好にコア抗原を検出できることが示された。

##### 【0068】実施例5. コア抗原の検出および測定法

血清100μlに、処理液(6M塩酸グアニジン、0.

5N HCl, 12.5% Triton X100, 0.75% Tween 20) を100  $\mu$ l 添加した。室温で30分間処理をおこない、その100  $\mu$ l を測定試料とした。抗HCVコア抗原モノクローナル抗体(C11-14とC11-11等量混合)を終濃度が計6  $\mu$ g/ml になるように0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈し、96ウエルマイクロプレート(ヌンク社製)1ウエルにつき100  $\mu$ l ずつ分注した。

【0069】4℃で一晩静置後、0.15M NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3) 0.35mlを用いて2回洗浄し、ブロッキング液0.35mlを添加し、さらに室温で2時間静置した。ブロッキング液を除去後、反応緩衝液150  $\mu$ l と前述した処理法で得た測定試料をそれぞれのウエルに加え、室温で2時間反応させた。

【0070】洗浄液300  $\mu$ l で5回洗浄し、さらにペルオキシダーゼ(POD)標識したモノクローナル抗体(C11-10)100  $\mu$ l を添加して室温で3分間反応させた。洗浄液300  $\mu$ l で5回洗浄し、基質(OPD)溶液100  $\mu$ l を加え室温で45分間反応させた後、2N硫酸溶液100  $\mu$ l を添加し、波長630nmの吸光度を対照として波長492nmにおける吸光度(OD492)を測定した。尚、標準血清として、パネル血清50を1U/mlとして、1%BSAを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)で段階的に希釈したものについて同様に処理をおこない測定した。

【0071】図5に、標準血清として使用したパネル血清50の希釈直線を示した。試料中コア抗原が濃度依存的に測定されており、約0.5mU/mlの検出が可能であった。すなわち、本発明の極めて簡易な検体処理法と

モノクローナル抗体を組み合わせる用いることにより、コア抗原を検出または定量できることが明らかとなった。

#### 【0072】実施例6. 血清処理と測定法で認識されている分子形の解析

パネル血清13の0.25mlを各々血清処理法で処理し、ゲルロカラム(Superdex 200HR, 1x30)で分画し、それらのフラクション中の抗コア免疫活性を測定し、その結果を図6に示した。分子量約20~30kDaの分子を認識していると考えられ、ウイルス中のコア抗原は前述した前処理によって、ウイルス破壊および血清中に存在する抗コア抗体の不活化により、様々な相互作用から遊離されていることが示された。

#### 【0073】実施例7. 血清試料中のコア抗原の測定法

PCR法であるアンプリコアHCVモニターキット(ロッシュ社)を用いてHCV-RNA量が $10^3 \sim 10^7$ コピー/mlと測定された血清と健康人血清を用い、前述の方法で、血清中のHCVコア抗原の定量を行なった。また、標準血清として、パネル50血清(1U/mlと設定)を1%BSAを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)にて段階的に希釈し、同様に処理したものをを用い、表2にその測定結果を示した。今回測定した検体のうち、健康人検体は全て検出限界以下であり、PCR法陽性例の全てを検出できた。このときの相関性を図7に示したが、PCR法との相関係数も0.8以上となり高い相関性を示した。

#### 【0074】

#### 【表2】

表2. HCV-RNA量とコア抗原量

サンプルNo.	RNA (Kコピー/ml)	コア抗原 (mU/ml)
健康人血清	1	—
	2	—
	3	—
	4	—
	5	—
	6	—
	7	—
パネル血清	1	50
	7	830
	8	26
	11	240
	13	1600
	15	25
	16	400
	19	840
	26	87
	31	30
	33	16
	39	97
	41	170
	44	180
	49	33
	50	1000
	84	8.7

N.D: Not detect

20

\* (A) 長さ: 177

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

\*

Met	Lys	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Lys	Gly	Ser	Leu	Asp	Arg	Asp	Pro	Glu	
5					10					15						
Phe	Met	Gly	Thr	Asn	Pro	Lys	Pro	Gln	Arg	Lys	Thr	Lys	Arg	Asn	Thr	
20					25					30						
Asn	Arg	Arg	Pro	Gln	Asp	Val	Lys	Phe	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	Val	
35					40					45						
Gly	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Leu	Gly	Val	Arg	
50					55					60						
Ala	Thr	Arg	Lys	Thr	Ser	Lys	Arg	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Gly	Arg	Arg	
65					70					75					80	
Pro	Ile	Pro	Lys	Asp	Arg	Arg	Ser	Thr	Gly	Lys	Ser	Trp	Gly	Lys	Pro	
85					90					95						
Gly	Tyr	Pro	Trp	Pro	Leu	Tyr	Gly	Asn	Glu	Gly	Leu	Gly	Trp	Ala	Gly	
100					105					110						
Trp	Leu	Leu	Ser	Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Pro	Ser	Trp	Gly	Pro	Thr	Asp	
115					120					125						
Pro	Arg	His	Arg	Ser	Arg	Asn	Val	Gly	Lys	Val	Ile	Asp	Thr	Leu	Thr	
130					135					140						
Cys	Gly	Phe	Ala	Asp	Leu	Met	Gly	Tyr	Ile	Phe	Arg	Val	Gly	Ala	Phe	
145					150					155					160	
Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	His	Gly	Val	Arg	Val	Leu	Glu	
165					170					175						

(B) 型：アミノ酸

30 (D) トポロジー：直鎖状

( i i ) 配列の種類：ペプチド

Met	Gly	Thr	Asn	Pro	Lys	Pro	Gln	Arg	Lys	Thr	Lys	Arg	Asn	Thr	Asn
				5					10					15	
Arg	Arg	Pro	Gln	Asp	Val	Lys	Phe	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	Val	Gly
			20					25					30		
Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Leu	Gly	Val	Arg	Ala
		35					40					45			
Thr	Arg	Lys	Thr	Ser	Lys	Arg	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Gly	Arg	Arg	Pro
		50				55					60				
Ile	Pro	Lys	Asp	Arg	Arg	Ser	Thr	Gly	Lys	Ser	Trp	Gly	Lys	Pro	Gly
	65					70				75					80
Tyr	Pro	Trp	Pro	Leu	Tyr	Gly	Asn	Glu	Gly	Leu	Gly	Trp	Ala	Gly	Trp
				85					90					95	
Leu	Leu	Ser	Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Pro	Ser	Trp	Gly	Pro	Thr	Asp	Pro
			100					105					110		
Arg	His	Arg	Ser	Arg	Asn	Val	Gly	Lys	Val	Ile	Asp	Thr	Leu	Thr	Cys
		115					120				125				
Gly	Phe	Ala	Asp	Leu	Met	Gly	Tyr	Ile	Phe	Arg	Val	Gly	Ala	Phe	Leu
	130					135					140				

21

22

Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp  
 145 150 155 160

【0077】(2) 配列番号: 3:

\* (B) 型: アミノ酸

(i) 配列の特性:

(D) トポロジー: 直鎖状

(A) 長さ: 20

\*

(ii) 配列の種類: ペプチド

Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu  
 5 10 15

Leu Pro Arg Arg

20

【0078】(2) 配列番号: 4:

※ (i) 配列の特性:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 21

(A) 長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg

5

10

【0079】(2) 配列番号: 5:

※

(ii) 配列の種類: ペプチド

Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg His Arg  
 5 10 15

Ser Arg Asn Val Gly

20

## 【図面の簡単な説明】

【図1】検体処理において塩酸グアニジン添加濃度による効果を検討した結果を示す図である。健常人血清 (normal) およびHCV-RNA陽性パネル血清13, 50を使用した。

【図2】検体処理においてTriton X100添加濃度による効果を検討した結果を示す図である。健常人血清 (normal) およびHCV-RNA陽性パネル血清13, 50を使用した。

【図3】検体処理においてTween20添加濃度による効果を検討した結果を示す図である。健常人血清 (normal) およびHCV-RNA陽性パネル血清13, 50を使用した。

【図4】検体処理中の温度による効果を検討した結果を示す図である。健常人血清 (normal) およびHCV-RNA陽性パネル血清13, 50を使用した。

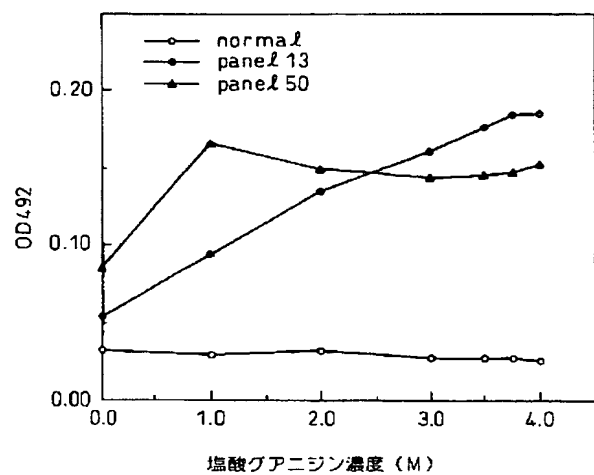
V-RNA陽性パネル血清13, 50を使用した。

【図5】標準血清のパネル血清50を1U/mlとして段階的に希釈し、検体処理した試料をサンドイッチ免疫アッセイ反応系で測定したときの希釈検量線と検出感度を示す図である。

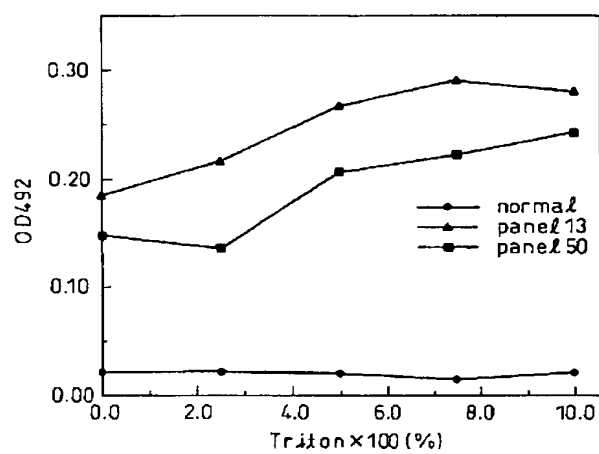
【図6】パネル血清13を、検体処理をおこなってから、ゲルロカラムを用いて分画し、その分画中のコア抗原活性を測定したものである。分子量は、IgGは約150kD、アルブミンは約68kDである。

【図7】アンプリコアHCVモニターキットで陽性を示した検体について、本発明の検体処理後その遊離したコア抗原活性を測定した値とアンプリコアHCVモニター (PCR法) で求めたHCV-RNA量との相関性を示す図である。

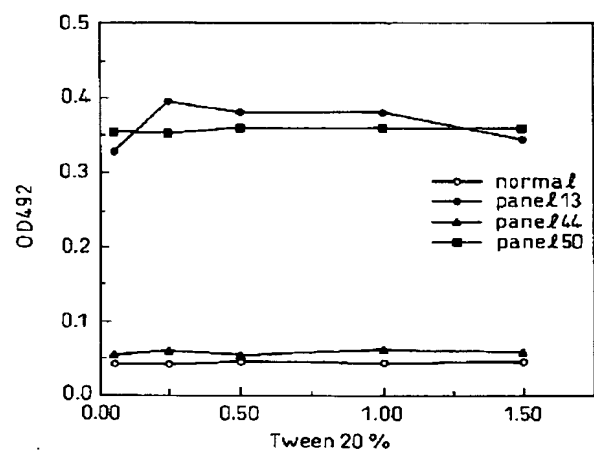
【図1】



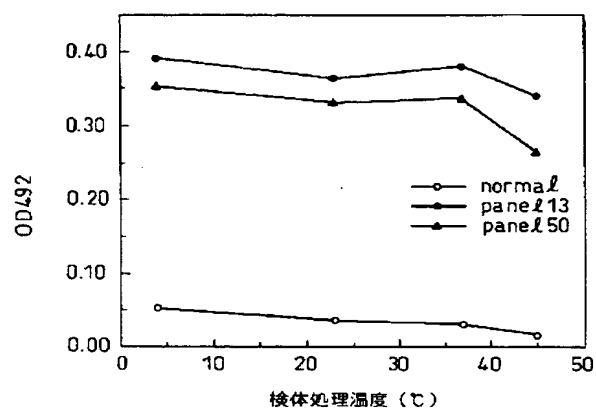
【図2】



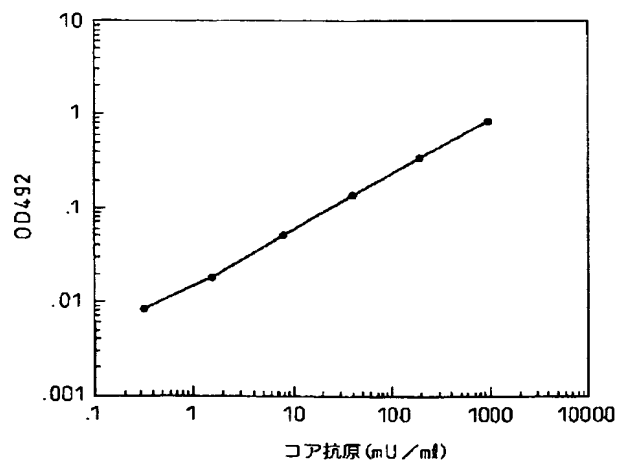
【図3】



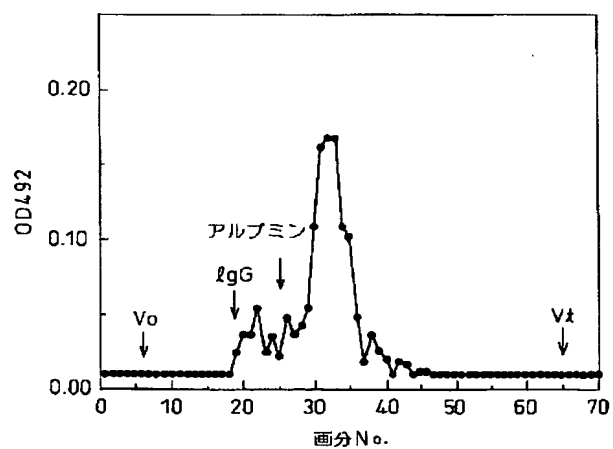
【図4】



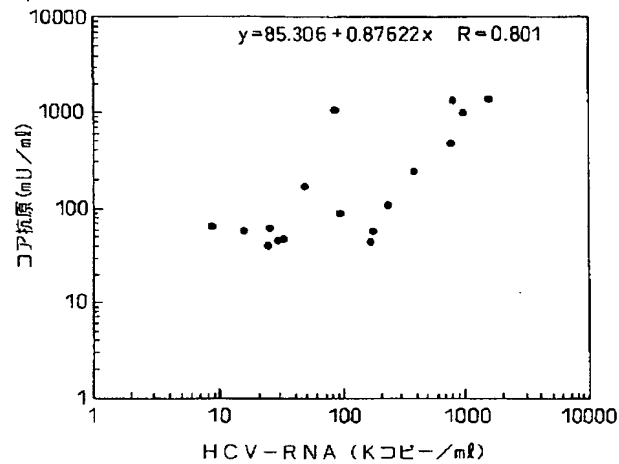
【図5】



【図6】



【図7】



## 【手続補正書】

【提出日】平成10年3月10日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0058

【補正方法】変更

【補正内容】

【0058】得られたハイブリドーマについて、常法の

限界希釈法に従い、単一クローン化を行ない、得られたハイブリドーマをHC11-14、HC11-10、およびHC11-11と命名した。該3種類のハイブリドーマに関しては、生命工学工業技術研究所に平成9年7月4日付で、それぞれ、FERM BP-6006, FERM BP-6004及びFERM BP-6005として寄託された。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 木村 達治

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1  
号 東燃株式会社総合研究所内

(72)発明者 飯田 久美子

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1  
号 東燃株式会社総合研究所内

(72)発明者 八木 慎太郎

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1  
号 東燃株式会社総合研究所内